

骨治癒過程におけるビスフォスフォネート系製剤による

T リンパ球への影響の検討

中辻 和樹

The effects of bisphosphonate on T lymphocyte
in bone healing process

Kazuki NAKATSUJI

緒言

ビスフォスフォネート製剤 (BP) は骨粗鬆症の治療の第一選択薬であり、乳癌や前立腺癌の骨転移、変形性骨炎、その他骨吸収性病態に対する治療薬として広く使用されている。しかし、2003 年、Marx らにより、BP 内服の副作用として抜歯後の顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: BRONJ) が報告された¹⁾。現在、BRONJ の発生頻度は経口投与では患者 10 万人当たり発生率は 1.04-69 人、静注投与では患者 10 万人あたり発生率は 0-90 人とされており²⁾³⁾、発生頻度は低いものの、進行性で遷延化しやすい難治性の疾患である。BRONJ に関して様々な研究が行われているが、未だ発生機序が不明である。しかし、これらの研究により、BRONJ 発生には骨代謝回転異常⁴⁾⁵⁾、血管新生抑制⁶⁾⁷⁾、創傷治癒遅延⁸⁾、口腔内細菌の関与⁹⁾が報告されている。BP は骨に選択的に取り込まれ、破骨細胞のアポトーシスを引き起こすことで、骨吸収を抑制することが知られている。しかし、近年、BP は破骨細胞だけではなく、骨芽細胞¹⁰⁾、角化細胞¹¹⁾¹²⁾、線維芽細胞¹³⁾¹⁴⁾にも影響を与えることが明らかにされている。一方、BP 投与時の急性期反応の出現に際し、末梢血中の T 細胞の一種である $\gamma \delta$ T 細胞が関与するとの報告があり¹⁵⁾、骨治癒過程においては、 $\gamma \delta$ T 細胞が増加し、IL-17 を産生することで骨芽細胞の成長に関与していることが明らかにされた¹⁶⁾。また骨粗鬆症では、閉経に伴う末梢血や骨髓中の T リンパ球の減少が示されている¹⁷⁾¹⁸⁾。このことから、BP 投与が、免疫系に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。

本研究では、骨治癒過程における BP の T リンパ球分画への影響を明らかにすることを目的とし、野生型マウスを用いて、ゾレドロネート投与後に大腿骨を削合し、骨髓、末梢血、胸腺、脾臓における T リンパ球分画への影響、さらにリンパ球分画に影響する関連因子として、血清中サイトカインの濃度の変化

を検討した。

材料ならびに方法

I. 実験動物モデル作製

実験動物には 12 週齢 C57BL/6J 雌性 Wild マウス（日本クレア、日本）を使用し、control として生理食塩水（ $200 \mu\text{l/body/day}$, 3days/week ）を腹腔内投与した control 群とゾレドロネート（日本化薬株式会社、日本）

（ $200 \mu\text{g/kg/day}$, 3days/week ）を投与した zol 群に分け、各群ともに 12 週間薬剤投与した。薬剤投与量及び投与方法は過去の報告をもとに決定し、¹⁹⁻²⁷ 実験期間中、飼料は固形飼料 CE-2（日本クレア）と水を常時与えた。薬剤投与開始 4 週後に塩酸メデトミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノールの三種混合麻酔薬による全身麻酔を行い右側大腿骨近位骨端下部に、直径 1.4mm のラウンドバーを用いてドリリングを行った。ドリリング直後、2 週後、4 週後に血清生化学的解析のため、アニマルランセットを用いて、顎骨後方より穿刺し採血を行った。12 週間の薬剤投与終了後、三種混合麻酔による全身麻酔を行い、後大静脈より血液を採取し、脱血後に大腿骨、胸腺、脾臓を採取した。

尚、この実験は岡山大学動物実験管理委員会の指針に従い、承認を得たうえで行った。（承認番号 OKU-2016183）

II. 大腿骨の組織学的観察

大腿骨を摘出し、直ちに 10% 緩衝ホルマリンに 24 時間浸漬し固定した。固定後に 10% EDTA で 30 日間脱灰後、通法に従いアルコール脱水しパラフィン包埋を行った。包埋後に $4 \mu\text{m}$ の薄切切片を作製し、組織学的観察のために通法に従いヘマトキシリン-エオジン染色（H-E 染色）を行った。また、T リンパ球、CD4 陽性細胞の転写因子である Th-Pok、CD8 陽性細胞の転写因子である

RUNX の観察のため、各々抗 CD3 抗体 (Anti-CD3 antibody ab16669; Abcam UK)、抗 Th-Pok 抗体 (Anti-ThPok antibody ab70991; Abcam UK)、抗 RUNX 抗体 (Anti-RUNX1/AML1+RUNX3+RUNX2 antibody ab92336; Abcam UK) を用いて、プロトコールに従って免疫組織化学染色を行った。各細胞数は単位視野 ($100 \times 100 \mu m^2$) あたりの陽性細胞数を計測した。

III. 胸腺細胞、脾臓細胞および末梢血血液細胞のフローサイトメトリー解析

胸腺および脾臓は Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen, USA) 中でホモジナイズした後、細胞浮遊液を回収し $300 \times g$ 、 $4^\circ C$ で 15 分間遠心分離し、上清を除去後ペレットを HBSS で攪拌し、白血球が $1.0 \times 10^7/ml$ となるように調整後、anti-mouse CD45-FITC、anti-mouse CD3e-PE/Cy7、anti-mouse CD4-BV421、anti-mouse CD8a-APC、anti-mouse TCR γ/δ -PE (BioLegend, USA)、7-AAD Viability Dye (Beckman Coulter, USA) で染色を行いサンプルとした。末梢血はヘパリンコーティングしたシリンジを用いて後大静脈より採取した。末梢血は、CD45、CD3e、CD4、CD8a、TCR γ/δ 、7-AAD の染色を行った後に VersaLyse Lysing Solution (Becman Coulter) にて溶血し、 $300 \times g$ 、 $4^\circ C$ で 15 分間遠心分離し、上清を除去後に Stain Buffer (BD Pharmingen, USA) を加えてサンプルとした。各サンプルは BD FACS Aria (Becton, Dickinson and Company, USA) にてフローサイトメトリーを行い、解析には解析用ソフトウェア (FlowJo v.10; トミーデジタルバイオロジー、日本) を用いた。

IV. 血清生化学的検討

大腿骨ドリリング時、ドリリング 2 週間後、ドリリング 4 週間後にアニマルランセットを用いて、顎骨後方より穿刺し採取した末梢血は $1000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で 15

分間遠心し血清を分離した。分離した血清は使用するまで-80℃で冷凍保存した。解凍後に血清中サイトカインを網羅的に解析するため、マルチプレックスアッセイキット (Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Th17 Panel A 6-Plex;Bio-Rad,USA) を用いて、プロトコールに従って、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α の血清中濃度を測定した。測定は Bio-Plex 200 (Bio-Rad,USA) で行い、解析には解析用ソフトウェア (Bio-Plex Manager Software ver.6.1;Bio-Rad) を用いた。

V.統計学的検討

結果より得られたデータは、Mann-Whitney の U 検定による比較を行い、危険率 5% で有意差検定を行った。統計解析には解析ソフトウェア (SPSS version23.0;IBM,USA) を用いた。

結果

I.大腿骨近位骨端部の組織学的観察

マウス大腿骨近位骨端部を H-E 染色、抗 CD3 抗体、抗 Th-Pok 抗体、抗 RUNX 抗体免疫組織化学染色により観察した結果を図 1 に示す。H-E 染色による組織学的観察の結果、control 群と比べて zol 群では海綿骨の骨梁の増加を認め、皮質骨の肥厚を認めた。各免疫組織化学染色における結果は図 1.b、図 1.c のように変化を認めた。すなわち、Control 群と比べて Zol 群では CD3 陽性細胞数は増加傾向を認めた。CD4 陽性細胞の転写因子である Th-Pok は増加傾向を認め、Th-Pok 転写因子の抑制因子であり、CD8 陽性細胞の転写因子である RUNX は有意な減少を認めた。

II. 胸腺細胞、脾臓細胞および末梢血血液細胞のフローサイトメトリー解析

胸腺細胞、脾臓細胞および末梢血血液細胞のフローサイトメトリー解析の結果を図 2-4 に示す。各項目の割合は T リンパ球に対する割合を示す。

胸腺細胞では、control 群と比較して zol 群は CD4SP 細胞、CD8SP 細胞、DN 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞で増加傾向を認め、DP 細胞で有意な減少を認めた。脾臓細胞では、control 群と比較して zol 群では、CD4SP 細胞、DN 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞で増加傾向を認め、CD8SP 細胞、DP 細胞で有意な減少を認めた。末梢血において、control 群と比較して zol 群は CD4 シングルポジティブ (SP) 細胞で増加傾向を認めた。CD8SP 細胞では有意な減少を認め、CD4CD8 ダブルネガティブ (DN) 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞では減少傾向を認めた。末梢血においては、いずれの群も CD4CD8 ダブルポジティブ (DP) 細胞は測定されなかった。

III. 血清生化学的検討

解析を行った 6 項目のうち、変化を認めたのは IL-1 β 、IL-10、IL-17、TNF- α の 4 項目であった。その結果を図 5 に示す。IL-1 β は control 群と比較して zol 群の方がいずれの場合も減少傾向にあり、ドリリング 2 週後は有意な減少を認めた。IL-10 と IL-17 は、ドリリング直後は zol 群の方が増加傾向を認めたが、ドリリング 2 週後、4 週後は zol 群の方が減少傾向を認めた。TNF- α はドリリング直後、ドリリング 2 週後は zol 群の方が減少傾向を認めたが、ドリリング 4 週後は zol 群の方が増加傾向を認めた。

考察

BP は骨組織に吸着した後、破骨細胞による骨吸収の際に破骨細胞内に取り込まれる。その結果、破骨細胞の不活化、アポトーシスを引き起こすことで強力な骨吸収抑制作用を引き起こす²⁸⁻³³⁾。BP 投与により骨梁が増加するとの報告があり^{19, 34, 35)}本研究でも同様の結果をえられたため、実験モデル作製は適切で

あったと考えられる。BP 投与により、骨髄における T リンパ球数、Th-Pok 転写因子は増加傾向を認め、RUNX 転写因子は減少傾向を認めた。Th-Pok 転写因子は、胸腺で DP 細胞が CD4SP 細胞への分化で必須の転写因子として 2005 年に報告された³⁶⁾。これまで、DP 細胞から T 細胞への分化は、自己発現する T 細胞レセプター (TCR) と抗原提示細胞上の主要組織適合抗原 (MHC) によって提示される自己抗原によって方向性が決定されるとされてきた³⁷⁾が、この TCR の MHC 拘束性による制御に関わらず、Th-Pok 転写因子を強制発現させることで DP 細胞がすべて CD4SP 細胞へと分化し、Th-Pok 転写因子を欠損させるとすべて CD8SP 細胞へ分化することが報告された³⁶⁾。一方、RUNX 転写因子は CD4 遺伝子の発現を抑制する制御領域 (サイレンサー) に結合し、CD4 遺伝子を不活化させる転写因子として 2002 年に報告され³⁸⁾、その後 RUNX 転写因子は Th-Pok サイレンサーに結合し Th-Pok 転写因子の発現を抑制することが明らかにされた³⁹⁾。すなわち、DP 細胞の分化の方向性を決定する転写因子は Th-Pok 転写因子で、RUNX 転写因子は Th-Pok 転写因子の発現を制御する転写因子であることが明らかにされた。本結果で、BP 投与により Th-Pok 転写因子が増加傾向を認め、RUNX 転写因子が有意な減少を認めたことから、T リンパ球の分面に影響を与えている可能性が示唆された。

フローサイトメトリー解析の結果においては、BP 投与により、胸腺細胞では CD4SP、CD8SP 細胞の増加傾向を認め、脾臓細胞および末梢血血液細胞では、CD4SP 細胞は増加傾向を認め、CD8SP 細胞は有意な減少を認めた。胸腺細胞では BP 投与により T リンパ球の分化が促進される結果となった。大腿骨骨髄における免疫組織化学染色の結果では、BP 投与により、CD4SP 細胞の転写因子である Th-Pok 転写因子が増加傾向を認め、CD8SP 細胞の転写因子である RUNX 転写因子は有意な減少を認めた。この結果から、BP 投与により、骨髄

においては CD4SP 細胞への分化が優利な環境が予想される。脾臓細胞および末梢血血液細胞のフローサイトメトリー解析の結果では、骨髄での Th-Pok 転写因子、RUNX 転写因子の状況を支持するように、BP 投与により CD4SP 細胞は増加傾向を示し、CD8SP 細胞は有意な減少を示した。このことから、脾臓および末梢血中での CD4SP 細胞および CD8SP 細胞の関係は、骨髄における Th-Pok 転写因子、RUNX 転写因子の関係を反映すると思われた。CD8SP 細胞は細胞傷害性 T 細胞に分化する細胞であり、病原体に感染した細胞を破壊する免疫応答上重要な役割を果たしている細胞であり、CD8SP 細胞の減少が、骨損傷部での易感染性を引き起こす可能性が考えられる。 $\gamma\delta$ T 細胞は T リンパ球の中の DN 細胞の分画の一つであり、ヒト末梢血中に数%含まれている⁴⁰⁾⁴¹⁾。他の T 細胞は $\alpha\beta$ 型 TCR を発現しているのに対し、 $\gamma\delta$ T 細胞は $\gamma\delta$ 型 TCR を発現しており、 $\alpha\beta$ 型 T 細胞よりも早期に分化し、皮膚、生殖器、腸管上皮へ分布する。 $\gamma\delta$ T 細胞は T 細胞の分画のひとつであるが、獲得免疫系のように認識した抗原に対し食作用を発揮する一方で、自然免疫系のように直接ターゲット抗原を認識し、迅速に感染防御を行う役割も担い、免疫機能上重要な役割を示している⁴²⁾。 $\gamma\delta$ T 細胞は悪性腫瘍の分野で、IL-2 とゾレドロネートで刺激培養することにより選択的に活性化、増幅し免疫療法に用いられている⁴³⁾⁴⁴⁾。骨粗鬆症の分野では、BP 初回投与後 3 日以内に発生し、1 週間以内に消失する一過性の発熱、背部痛、倦怠感、関節痛などのインフルエンザ様症状が出現することがある¹⁵⁾。これを急性期反応 (APR) といい、APR は BP 連日投与ではほとんど認められないが、週 1 回投与、月 1 回投与、年 1 回投与では高頻度に発生が認められるとの報告がある⁴⁵⁻⁴⁸⁾。BP 投与により、メバロン酸代謝過程でファルネシルピロリン酸合成酵素を阻害し、イソペンテニルピロリン酸 (IPP) が上昇する。集積した IPP を抗原として、 $\gamma\delta$ T 細胞が活性化、増殖され、TNF- α

や IL-6 が合成され APR が生じると考えられている⁴⁹⁻⁵¹⁾。前述のように、骨治癒過程において $\gamma\delta$ T 細胞が IL-17 を産生し、骨芽細胞を活性化させ、骨治癒を促進させるとの報告がある¹⁶⁾。本結果では、 $\gamma\delta$ T 細胞は末梢血においては減少傾向を認め、胸腺細胞および脾臓細胞では増加傾向を認めた。今回は、骨髄における $\gamma\delta$ T 細胞の変化の観察は免疫組織化学染色においてもフローサイトメトリー解析においても細胞数が少なく困難であった。BP 投与による $\gamma\delta$ T 細胞の変化が骨治癒過程に関与することが予想されるが今後の研究課題としたい。

各種サイトカインも T リンパ球の動態に関わっており、本研究で変動のあった 4 項目はいずれも炎症性サイトカインに分類される。IL-1 β は急性期に働くサイトカインとして知られているが、RANKL の発現・産生を促し、破骨細胞前駆細胞の受容体 RANK と RANKL 産生細胞が結合することにより、破骨細胞の分化・形成を起こす。さらに分化した破骨細胞が、IL-1 β を産生し破骨細胞を活性化させるとの報告もある⁵²⁾。IL-10 は免疫反応の抑制機構をつかさどる分子の一つであり、主に CD4SP 細胞である Th2 細胞と T-reg 細胞から産生される。IL-10 は TNF- α の末梢血単球から発現および放出を阻害する働きがある⁵³⁾。TNF- α は主にマクロファージにより産生され、Th1 細胞により産生された IFN- γ と相乗的に作用し、マクロファージを活性化させる。活性化されたマクロファージにより、MHC クラス II 分子の発現が上昇し、CD4SP 細胞を活性化させ、Th1 細胞へと分化させる³⁷⁾。また、TNF- α は IL-1 β 同様に RANKL の産生を促進させ、破骨細胞の分化誘導を促進させるとの報告がある。IL-17 は活性化された T 細胞より放出され、IL-1 や TNF- α などの炎症性サイトカインなどを誘導し、炎症を誘導することが知られている。前述のように、骨治癒過程において骨芽細胞を活性化させる因子である。本結果では骨治癒過程における血清サイトカイン濃度を経時的に観察した。BP 投与により、IL-1 β がいずれの場合も減

少傾向を認め、TNF- α と IL-10 はほぼ拮抗しているデータを示した。IL-17 は BP 投与により、ドリリング直後は増加傾向を認めたが、2 週後、4 週後は経時的に減少傾向を認めた。IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 の結果から、BP 投与により破骨細胞の抑制が予想され、IL-17 の結果から、骨芽細胞の抑制が予想される。このことから、BP 投与が破骨細胞、骨芽細胞を抑制する働きを示し、骨代謝サイクルに異常をきたしている可能性が考えられる。BP 投与による骨芽細胞への影響については、骨芽細胞の分化を活性化する報告¹⁰⁾⁵⁴⁾、抑制させる報告⁵⁵⁾⁵⁶⁾で意見が分かれており、一定の見解を得ていないが、本結果は BP 投与が骨芽細胞の活性を抑制させる意見を支持するものとなった。

BP 投与によって T リンパ球に起こる動態の変化が、正常な免疫恒常性の維持を困難にさせていることが推測された。また、血清サイトカインにおける結果からも破骨細胞、骨芽細胞の活性の抑制が示され、骨代謝サイクルに異常をきたしている可能性があることで、骨への感染防御を困難にしている可能性が示唆された。このことは BRONJ の病因や発生機序の解明の一助となる可能性があり、免疫系の改善が BRONJ 予防につながる可能性が示唆された。

結語

本研究より、BP 投与が骨治癒過程における T リンパ球分画およびその関連因子である血清サイトカインに与える影響が明らかとなった。BP 投与によって骨髓、リンパ組織および末梢血中で T リンパ球の動態に影響を与え、免疫恒常性の維持を困難にさせている可能性がある。血清中サイトカインでは破骨細胞、骨芽細胞を抑制させる方向へ変動していることが明らかとなり、BP が破骨細胞に直接取り込まれて効果を発揮するだけでなく、サイトカインにも影響を与

え、骨代謝回転を抑制している可能性が示唆された。このことは、今後 BRONJ の発生機序を検討する上で免疫系も検討項目の一つとなりうることが考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な機会を与えていただき、御指導と御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野 飯田征二教授に甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、終始懇切なる御指導をいただきました岡山大学病院口腔外科（再建系） 山近英樹講師に深く感謝の意を表します。さらに、様々な面にわたり御協力、御助言を賜りました岡山大学病院口腔外科（再建系） 松井裕一医員に心からの謝意を表します。最後に、貴重な御援助、御協力、御助言をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野ならびに岡山大学病院口腔外科（再建系）の諸先生方に謹んで御礼申し上げます。

文献

- 1). Marx, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws : a growing epidemic. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **2391**, 1115-1117. 2003.
- 2). Yoneda, T., Hagino, H., Sugimoto, T., Ohta, H., Takahashi, S., Soen, S., … Toyosawa, S. Antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw: Position Paper 2017 of the Japanese Allied Committee on Osteonecrosis of the Jaw. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, **35**, 6-19. 2017.
- 3). Khan, A. A., Morrison, A., Hanley, D. A., Felsenberg, D., McCauley, L. K., O' Ryan, F., … Compston, J. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: A systematic review and international consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*, **30**, 3-23. 2015.
- 4). Patschan, D., Loddenkemper, K., & Buttgerit, F. Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-induced Osteoporosis. *Bone*, **29**, 498-505. 2001.

- 5). Favia, G., Pilolli, G. P., & Maiorano, E. Histologic and histomorphometric features of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: An analysis of 31 cases with confocal laser scanning microscopy. *Bone*, **45**, 406-413. 2009.
- 6). Wood, J., Bonjean, K., Ruetz, S., Bellahcène, A., Devy, L., Foidart, J. M., ... Green, J. R. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **302**, 1055-61. 2002.
- 7). Estilo, C. L., Fournier, M., Farooki, A., Carlson, D., Bohle, G., & Huryn, J. M. Osteonecrosis of the jaw related to bevacizumab. *Journal of Clinical Oncology*, **26**, 4037-4038. 2008.
- 8). Landesberg, R., Cozin, M., Cremers, S., Woo, V., Kousteni, S., Sinha, S., ... Raghavan, S. Inhibition of Oral Mucosal Cell Wound Healing by Bisphosphonates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **66**, 839-847. 2008.
- 9). Naik, N. H., & Russo, T. a. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the role of actinomyces. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, **49**, 1729-1732. 2009.
- 10). Komatsu, K., Shimada, A., Shibata, T., Wada, S., Ideno, H., Nakashima, K., ... Nifuji, A. Alendronate promotes bone formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model. *Journal of Endocrinology*, **219**, 145-158. 2013.
- 11). Saito, T., Izumi, K., Shiomi, A., Uenoyama, A., Ohnuki, H., Kato, H., ... Maeda, T. Zoledronic acid impairs re-epithelialization through down-regulation of integrin $\alpha v \beta 6$ and transforming growth factor beta signalling in a three-dimensional in vitro wound healing model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **43**, 373-380. 2014.
- 12). McLeod, N. M. H., Moutasim, K. A., Brennan, P. A., Thomas, G., & Jenei, V. In vitro effect of bisphosphonates on oral keratinocytes and fibroblasts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **72**, 503-509. 2014.
- 13). Tipton, D. A., Seshul, B. A., & Dabbous, M. K. Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *Journal of Periodontal Research*, **46**, 39-47. 2011.
- 14). De Colli, M., Zara, S., di Giacomo, V., Patruno, A., Marconi, G. D., Gallorini, M., ... Cataldi, A. Nitric oxide-mediated cytotoxic effect induced by zoledronic acid treatment on human gingival fibroblasts. *Clinical Oral Investigations*. 2014.
- 15). Rossini, M., Adami, S., Viapiana, O., Ortolani, R., Vella, A., Fracassi, E., & Gatti, D. Circulating gammadelta T cells and the risk of acute-phase response after

- zoledronic acid administration. *J Bone Miner Res*, **27**, 227-230. 2012.
- 16). Ono, T., Okamoto, K., Nakashima, T., Nitta, T., Hori, S., Iwakura, Y., & Takayanagi, H. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells enhance bone regeneration. *Nature Communications*, **7**, 10928. 2016.
 - 17). Leposavić, G., Karapetrović, B., Obradović, S., Vidić Danković, B., & Kosec, D. Differential effects of gonadectomy on the thymocyte phenotypic profile in male and female rats. In *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (Vol. 54, pp. 269-276). 1996.
 - 18). Imai, Y., Tsunenari, T., Fukase, M., & Fujita, T. Quantitative bone histomorphometry and circulating t lymphocyte subsets in postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, **5**, 393-399. 1990.
 - 19). Sato, M., Zeng, G. Q., & Turner, C. H. Biosynthetic human parathyroid hormone (1-34) effects on bone quality in aged ovariectomized rats. *Endocrinology*, **138**, 4330-4337. 1997.
 - 20). Hornby, S. B., Evans, G. P., Hornby, S. L., Pataki, A., Glatt, M., & Green, J. R. Long-term zoledronic acid treatment increases bone structure and mechanical strength of long bones of ovariectomized adult rats. *Calcified Tissue International*, **72**, 519-527. 2003.
 - 21). Brouwers, J. E. M., van Rietbergen, B., & Bouxsein, M. L. Influence of early and late zoledronic acid administration on vertebral structure and strength in ovariectomized rats. *Calcified Tissue International*, **83**, 186-91. 2008.
 - 22). Bi, Y., Gao, Y., Ehrichtiou, D., Cao, C., Kikuri, T., Le, A., ... Zhang, L. Bisphosphonates Cause Osteonecrosis of the Jaw-Like Disease in Mice. *The American Journal of Pathology*, **177**, 280-290. 2010.
 - 23). Kubek, D. J., Burr, D. B., & Allen, M. R. Ovariectomy stimulates and bisphosphonates inhibit intracortical remodeling in the mouse mandible. *Orthodontics and Craniofacial Research*, **13**, 214-222. 2010.
 - 24). Bonnet, N., Lesclous, P., Saffar, J. L., & Ferrari, S. Zoledronate Effects on Systemic and Jaw Osteopenias in Ovariectomized Periostin-Deficient Mice. *PLoS ONE*, **8**. 2013.
 - 25). Abtahi, J., Agholme, F., & Aspenberg, P. Prevention of osteonecrosis of the jaw by mucoperiosteal coverage in a rat model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **42**, 632-636. 2013.
 - 26). Dayisoylu, E. H., Senel, F. C., Ungor, C., Tosun, E., Cankaya, M., Ersoz, S., & Taskesen, F. The effects of adjunctive parathyroid hormone injection on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: An animal study. *International*

- Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **42**, 1475-1480. 2013.
- 27). Williams, D. W., Lee, C., Kim, T., Yagita, H., Wu, H., Park, S., ... Kim, R. H. Impaired bone resorption and woven bone formation are associated with development of osteonecrosis of the jaw-like lesions by bisphosphonate and anti-receptor activator of NF- κ B ligand antibody in mice. *American Journal of Pathology*, **184**, 3084-3093. 2014.
 - 28). Pelorgeas, S., Martin, J. B., & Satre, M. Cytotoxicity of dichloromethane diphosphonate and of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate in the amoebae of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. A ³¹P NMR study. *Biochemical Pharmacology*, **44**, 2157-2163. 1992.
 - 29). Hughes, D. E., Wright, K. R., Uy, H. L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, D. G., ... Boyce, B. F. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, **10**, 1478-1487. 1995.
 - 30). Frith, J. C., Mönkkönen, J., Blackburn, G. M., Russell, R. G., & Rogers, M. J. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **12**, 1358-1367. 1997.
 - 31). Van Beek, E., Pieterman, E., Cohen, L., Löwik, C., & Papapoulos, S. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **264**, 108-111. 1999.
 - 32). Grove, J. E., Brown, R. J., & Watts, D. J. The intracellular target for the antiresorptive aminobisphosphonate drugs in *Dictyostelium discoideum* is the enzyme farnesyl diphosphate synthase. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **15**, 971-81. 2000.
 - 33). Rogers, M. J., Gordon, S., Benford, H. L., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Monkkonen, J., & Frith, J. C. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*, **88**, 2961-78. 2000.
 - 34). Miller, S. C., Bowman, B. M., Miller, M. A., & Bagi, C. M. Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope-specific changes following ovariectomy in rats. *Bone*, **12**, 439-446. 1991.
 - 35). Glatt, M., Pataki, A., Evans, G. P., Hornby, S. B., & Green, J. R. Loss of vertebral bone and mechanical strength in estrogen-deficient rats is prevented by long-term

- administration of zoledronic acid. *Osteoporosis International*, **15**, 707-715. 2004.
- 36). He, X., He, X., Dave, V. P., Zhang, Y., Hua, X., Nicolas, E., ... Kappes, D. J. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature*. 2005.
 - 37). Kenneth Murphy, Paul Travers, M. W. *Janeway's 免疫生物学 (原書第7版) (笹月健彦編)*, 南江堂, 東京. 2010.
 - 38). Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M. J., Bae, S. C., Komori, T., ... Littman, D. R. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*, **111**, 621-633. 2002.
 - 39). Setoguchi, R., Tachibana, M., Naoe, Y., Muroi, S., Akiyama, K., Tezuka, C., ... Taniuchi, I. Repression of the Transcription Factor Th-POK by Runx Complexes in Cytotoxic T Cell Development. *Science*, **319**, 822-825. 2008.
 - 40). Groh, V. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *Journal of Experimental Medicine*, **169**, 1277-1294. 1989.
 - 41). Carding, S. R., & Egan, P. J. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature Reviews. Immunology*, **2**, 336-45. 2002.
 - 42). Hayday, A. C. $\gamma \delta$ T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response. *Immunity*, **31**, 184-196. 2009.
 - 43). Wilhelm, M., Kunzmann, V., Eckstein, S., Reimer, P., Weissinger, F., Ruediger, T., & Tony, H.-P. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood*, **102**, 200-6. 2003.
 - 44). Nicol, A. J., Tokuyama, H., Mattarollo, S. R., Hagi, T., Suzuki, K., Yokokawa, K., & Nieda, M. Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *British Journal of Cancer*, **105**, 778-786. 2011.
 - 45). Miller, P. D., Mcclung, M. R., Macovei, L., Stakkestad, J. A., Luckey, M., Bonvoisin, B., ... Cooper, C. Monthly Oral Ibandronate Therapy in Postmenopausal Osteoporosis: 1-Year Results From the MOBILE Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, **20**, 1315-1322. 2005.
 - 46). Bock, O., Boerst, H., Thomasius, F. E., Degner, C., Stephan-Oelkers, M., Valentine, S. M., & Felsenberg, D. Common musculoskeletal adverse effects of oral treatment with once weekly alendronate and risedronate in patients with osteoporosis and ways for their prevention. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, **7**, 144-148. 2007.
 - 47). Black, D. M., Delmas, P. D., Eastell, R., Reid, I. R., Boonen, S., Cauley, J. A., ...

- Cummings, S. R. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*, **356**, 1809-22. 2007.
- 48). Rackoff, P. Efficacy and safety of risedronate 150 mg once a month in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Clinical Interventions in Aging*. 2009.
 - 49). Tanaka, Y., Morita, C. T., Nieves, E., Brenner, M. B., & Bloom, B. R. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature*. 1995.
 - 50). Gober, H.-J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., & De Libero, G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **197**, 163-8. 2003.
 - 51). Hewitt, R. E., Lissina, A., Green, A. E., Slay, E. S., Price, D. A., & Sewell, A. K. The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gd T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins. *Clinical and Experimental Immunology*, **139**, 101-11. 2005.
 - 52). Belibasakis, G. N., & Bostanci, N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*. 2012.
 - 53). Armstrong, L., Jordan, N., & Millar, A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax*, **51**, 143-9. 1996.
 - 54). Thibaut, F., Watrin, T., Meary, F., Tricot, S., Legros, V., Pellen-Mussi, P., & Chauvel-Lebret, D. Effects of zoledronic acid on osteoblasts in three-dimensional culture. *Journal of Dental Sciences*, **10**, 8-15. 2015.
 - 55). Shimizu, E., Tamasi, J., & Partridge, N. C. Alendronate Affects Osteoblast Functions by Crosstalk through EphrinB1-EphB. *Journal of Dental Research*, **91**, 268-274. 2012.
 - 56). Basso, F. G., Silveira Turrioni, A. P., Hebling, J., & De Souza Costa, C. A. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology*, **59**, 534-541. 2013.

図の説明

図 1.a 大腿骨の組織学的観察

H-E 染色では、BP 投与により骨梁の増大、海面骨の骨梁の増加、皮質骨の増大を認める。抗 CD3 陽性細胞、Th-Pok は増加傾向を認め、RUNX は有意に減少した。なお、スケールバーは H-E 染色は 200 μ m、免疫組織化学染色は 20 μ m である。

図 1.b 大腿骨における CD3 陽性細胞数の変化

単位視野 (100 \times 100 μ m²) あたりの CD3 陽性細胞数を比較した。BP 投与により、CD3 陽性細胞数は増加傾向を認めた。

図 1.c 大腿骨における Th-Pok、RUNX の変化

単位視野 (100 \times 100 μ m²) あたりの Th-Pok、RUNX の数を比較した。BP 投与により Th-Pok は増加傾向を認め、RUNX は有意に減少した。(* : P < 0.05、Mann-Whitney U test)

図 2 胸腺細胞のフローサイトメトリー解析

BP 投与により、CD4SP 細胞、CD8SP 細胞、DN 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞で増加傾向を認め、DP 細胞で有意な減少を認めた。(* : P < 0.05、Mann-Whitney U test、単位 : %)

図 3 脾臓細胞のフローサイトメトリー解析

BP 投与により、CD4SP 細胞、DN 細胞で増加傾向を認め、CD8SP 細胞、DP 細胞で有意な減少を認めた、 $\gamma\delta$ T 細胞はほとんど変化を認めなかった。(* : P < 0.05、Mann-Whitney U test、単位 : %)

図 4 末梢血血液細胞のフローサイトメトリー解析

BP 投与により、CD4SP 細胞で増加傾向を認め、CD8SP 細胞、DN 細胞で有意な減少を認めた。 $\gamma\delta$ T 細胞は減少傾向を認め、DP 細胞は検出されなかった。(* : P < 0.05、Mann-Whitney U test、単位 : %)

図 5 血清生化学的検討

IL-1 β は control 群と比較して zol 群の方がいずれの場合も減少傾向を認め、ドリリング 2 週後は有意に減少した。TNF- α はドリリング時、2 週後は zol 群の方

が減少傾向を認めたが、4 週後は zol 群の方が増加傾向を認めた。IL-10、IL-17 はドリリング時は zol 群に増加傾向を認めたが、2 週後、4 週後は zol 群に減少傾向を認めた。(* : $P < 0.05$ 、Mann-Whitney U test、単位 : pg/ml)

图 1. a

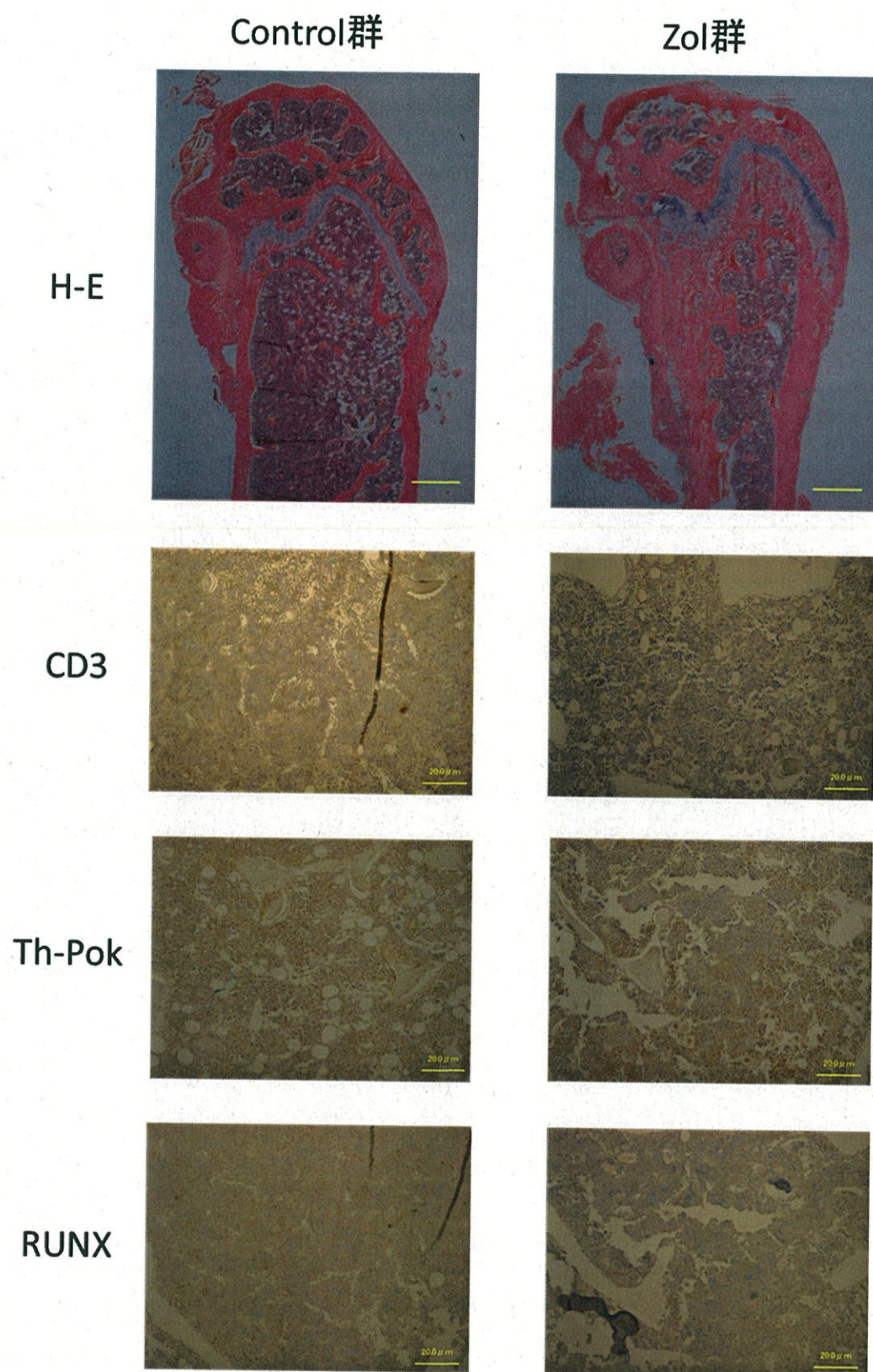


图 1.b

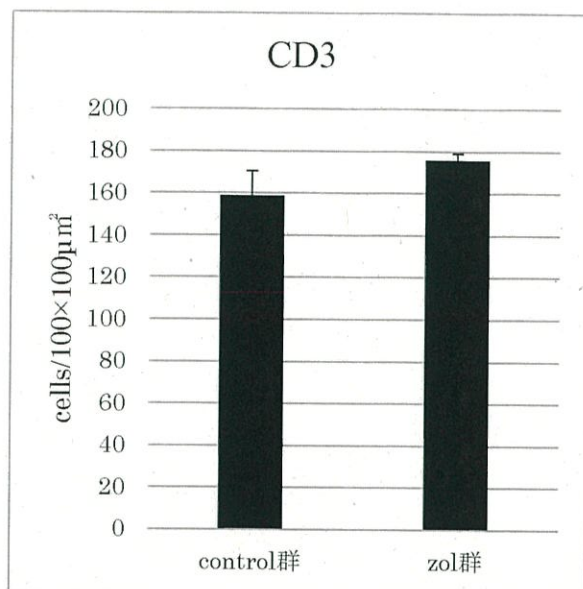


图 1.c

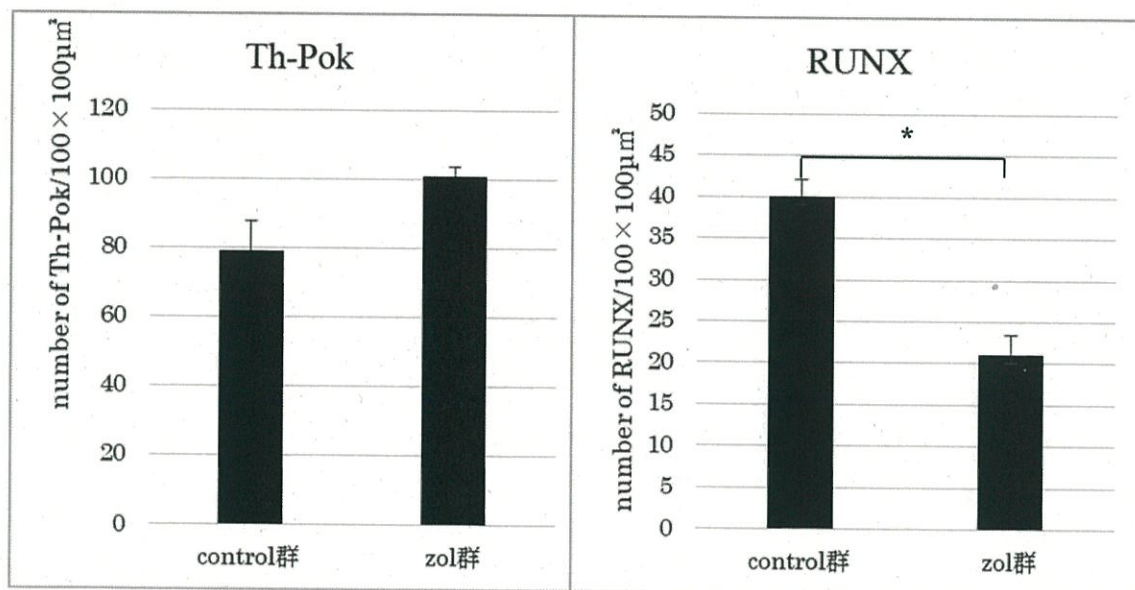


図 2

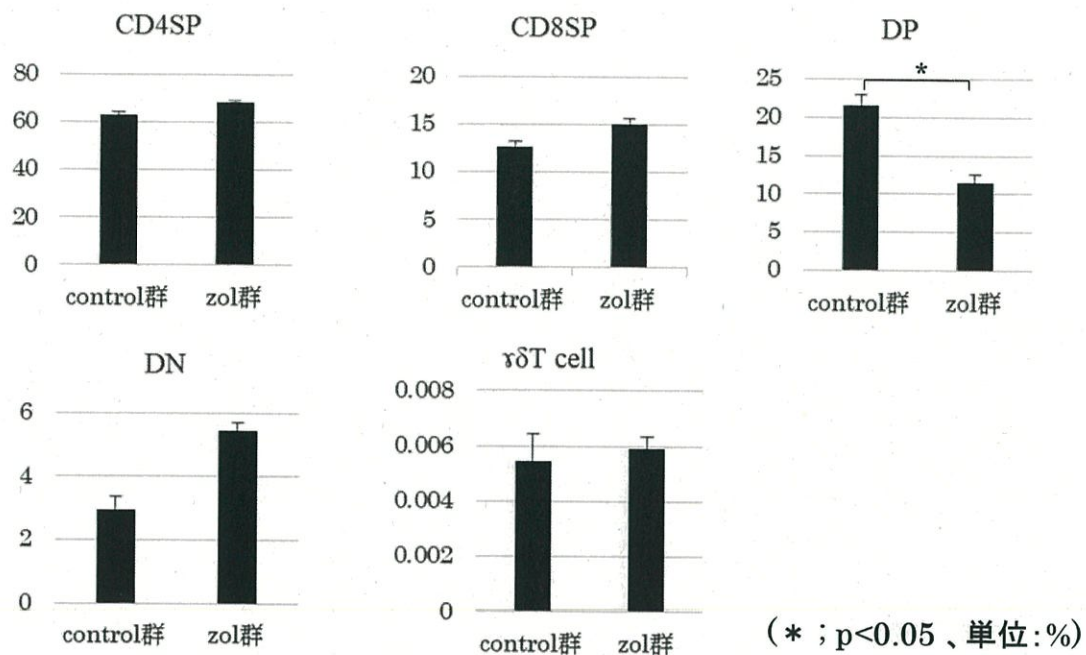


図 3

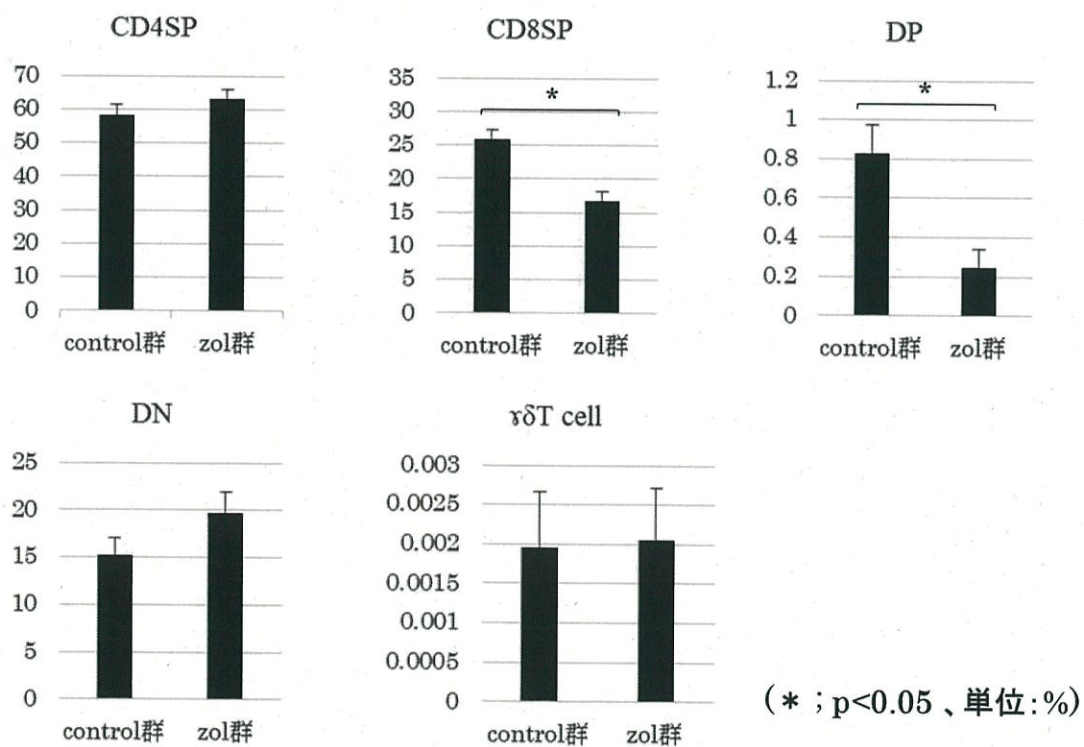
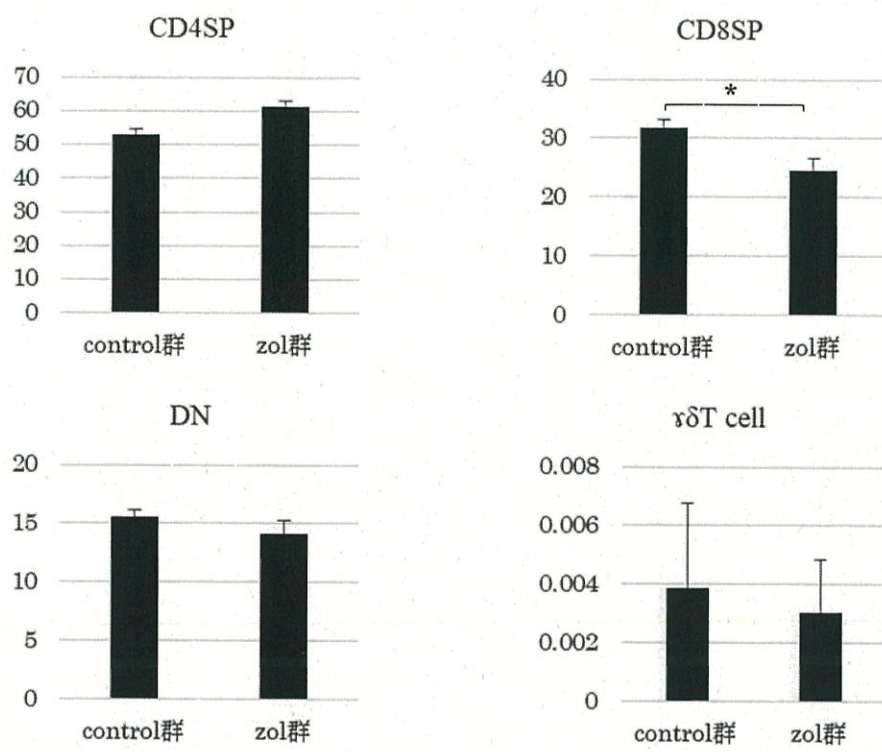
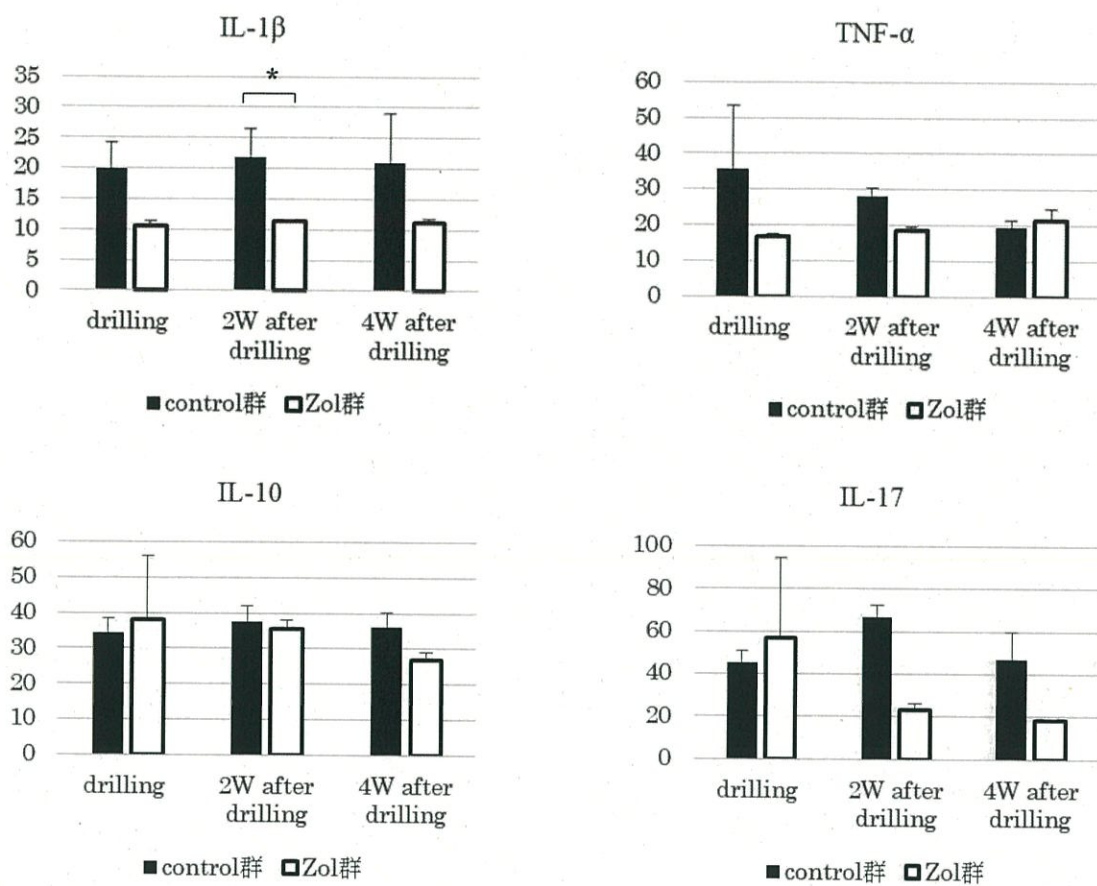


図 4



(* ; p<0.05、単位:%)

図 5



(* ; $p < 0.05$ 、単位:pg/ml)